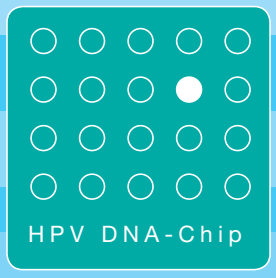


PapilloCheck®

Manual de instrucciones

Equipo de diagnóstico para la genotipificación de los tipos del virus del papiloma humano 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 en muestras cervicouterinas

REF 465 060

Para uso diagnóstico in vitro
únicamente por parte de personal de laboratorio profesional

Revisión: BQ-013-07
Agosto de 2011

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Alemania
Teléfono: +49 (0) 7022 948-0 • Fax +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/bioscience

greiner bio-one

Fabricado en Austria

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

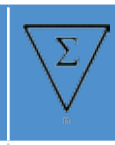
											
en	Store in the dark	Use by	Consult Instructions For Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Dianostic Medical Device	Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Irritant	Batch code	Important Note
de	Im Dunkeln lagern	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-Vitro-Diagnostika Medizinprodukt	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Reizend	Chargenbezeichnung	Wichtiger Hinweis
fr	À stocker à l'abri de la lumière	Date limite de conservation jusqu'au	Lire les instructions avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	irritant	N° de lot	Note importante
es	Conservar en un lugar oscuro	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstico in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	Irritante	Código de lote	Nota importante
it	Conservare al buio	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limitazione temperatura	Contenuto sufficiente per test <n>	Irritante	Codice del lotto	Nota importante
pt	Conservar num local escuro	A utilizar preferívelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	irritante	Código do lote	Aviso importante
nl	Donker bewaren	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperking	Voldoende inhoud voor <n> tests	Irriterend	Lot nummer	Belangrijke opmerking
da	Opbevares mørkt	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskdicin doagnose-apparat	Temperaturbegrænsær	Indeholder nok til <n> test	Lokalirriterende	Lotnummer	Vigtig henvisning
sv	Förvaras mörkt.	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro-medicinsk doagnostisk apparatur	Temperatur-begränsning	Innehållet räcker till <n> tester	irriterande	Lot nummer	Viktigt meddelande
pl	Przechowywa ć w ciemności	Termin zydatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produktyw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	drażniący	Kod partii	Ważne
no	Oppbevares mørkt	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	irriterende	batch nr.	Viktig merknad
el	Αποθηκεύεται στα σκοτεινά	το λιγότερο διατηρείται	πριν την χρήση διαβάστε τις οδηγίες	Αριθμός Καταλόγου	Παραγωγός	In vitro διαγνωστικά ιατρικά προϊόντα	περιορισμός θερμοκραοίας	Περιεχόμενο αροκετό για <n> τεοτ	ερεθιστικό	κωδικός παρτίδας	Σημαντική υπόδειξη
tr	Karanlık yerde saklayınız	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tahriş edici	Parti kodu	Önemli Not

TABLA DE CONTENIDO

1. CONTENIDO DEL EQUIPO 5

2. CONSUMIBLES, EQUIPO Y HARDWARE NECESARIOS 6

3. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO 8

4. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD 8

5. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS 9

6. INTRODUCCIÓN 10

- 6.1 Uso previsto 10
- 6.2 Tipos de VPH detectables con PapilloCheck® 10
- 6.3 Principio del ensayo 11
- 6.4 Diseño del microchip PapilloCheck® 13
  - 6.4.1 Distribución del microchip PapilloCheck® 13
  - 6.4.2 Controles del microchip 14

7. INSTRUCCIONES PARA LA SECUENCIA DE TRABAJO DE PAPILLOCHECK® 15

- 7.1 Instrucciones generales 15
- 7.2 Separación de las salas 15
- 7.3 Advertencias y precauciones 16
  - 7.3.1 Prevención de la contaminación 16
  - 7.3.2 Instrucción para la manipulación de microchips de ADN 16
  - 7.3.3 Precauciones generales 16
  - 7.3.4 Seguridad en el trabajo 17

8. PROCEDIMIENTO DE PAPILLOCHECK® 18

- 8.1 Toma de muestras y extracción de ADN 18
  - 8.1.1 Toma de muestras 18
  - 8.1.2 Extracción de ADN 20
- 8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 21
  - 8.2.1 Preparación del termociclador 21
  - 8.2.2 Tratamiento de uracil-N-glucosilasa (UNG) 22
  - 8.2.3 Preparación de la reacción PCR 23
- 8.3 Hibridación y lavado 25
  - 8.3.1 Preparación 25
  - 8.3.2 Hibridación 27
  - 8.3.3 Lavado y secado 29
- 8.4 Escaneado y evaluación del microchip PapilloCheck® 31

9. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS 32

10. ASISTENCIA TÉCNICA 33

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DE PAPILLOCHECK® 34

11.1 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DE PapilloCheck® 34
11.1.1 Sensibilidad analítica 34
11.1.2 Especificidad analítica - Tipos de VPH 35
11.1.3 Especificidad analítica - Organismos no VPH 35
11.2 Repetibilidad 36
11.3 Reproducibilidad 37
11.4 Solidez 38
11.5 Rendimiento clínico de PapilloCheck® 39

12. PROTOCOLO BREVE DE PAPILLOCHECK® 41

12.1 Sala 2: PCR - Preparación de la mezcla de reacción 41
12.2 Sala 2: PCR - Adición de ADN mensajero / reacción PCR 42
12.3 Sala 3: Hibridación - Preparación / Reacción de hibridación 43
12.4 Sala 3: Lavado y secado / Escaneo y evaluación 44

1. CONTENIDO DEL EQUIPO

Equipo de ensayo PapilloCheck®[1]	Contenido	Cantidad
PCR MasterMix	5 Papill**oCheck**® PCR MasterMix[2]	5 x 300 µl
Caja para portaobjetos, 5 x 12 matrices	1 caja para portaobjetos Papill**oCheck**® con 5 microchips Papill**oCheck**®[3]	5 x 12 matrices
Tampón de hibridación	2 Papill**oCheck**®	2 x 1000 µl
BUF A conc.	2 tampones A Papill**oCheck**® concentrado	2 x 40 ml
BUF B conc.	1 tampón B Papill**oCheck**® concentrado	1 x 15 ml

[1] Un equipo de ensayo Papill**oCheck**® es suficiente para el análisis de 60 muestras.
[2] Contiene todos los componentes necesarios para PCR, excepto Taq ADN polimerasa y uracil-N-glucosilasa.
[3] Un microchip Papill**oCheck**® contiene 12 micromatrices Papill**oCheck**®.

2. CONSUMIBLES, EQUIPO Y HARDWARE NECESARIOS

Se recomienda el uso de Papill**oCheck**® en combinación con los consumibles, el equipo y el hardware enumerados únicamente por parte de personal profesional.

Consumibles	N.º de catálogo de Greiner Bio-One	Cantidad
Equipo de ensayo Papill**oCheck**®	465 060	Equipo de ensayo para 60 reacciones
Equipo de toma de muestras Papill**oCheck**®	465 070	10 muestras
Equipo de extracción de ADN / Preparación con una columna oCheck®	515 040	Equipo de ensayo para 50 preparaciones
Equipo de extracción de ADN / Preparación con banda de 8 columnas oCheck®	515 050	12 x 8 preparaciones
Puntas de filtro de micropipeta libres de desoxirribonucleasa estériles[1]		
Puntas de filtro de 0,5-10 µl	765 288	96/960
Puntas de filtro de 0,5-20 µl	774 288	96/960
Puntas de filtro de 10-100 µl	772 288	96/960
Puntas de filtro de 10-200 µl	739 288	96/960
Puntas de filtro de 100-1000 µl	750 288	60/600
Microtubos libres de desoxirribonucleasa		
Microtubo de 1,5 ml	616 201	500/4000
Microtubo de 0,2 ml[2]	683 201	500/1000
8 bandas PCR de 0,2 ml	673 210	125/1250
Tiras de tapa para 8 bandas PCR de 0,2 ml	373 270	125/1250
Tubo de polipropileno de 50 ml[3]	210 261	25/450
Pipetas de plástico para pipeteador		
Pipeta de 10 ml	607 180 o 607 160	1/200
Pipeta de 25 ml	760 180 o 760 160	1/200
Pipeta de 50 ml	786 180 o 768 160	1/200

[1] Algunos de los tamaños de puntas mencionados son opcionales según las micropipetas disponibles.
[2] En principio, se recomienda el uso de las bandas PCR con 8 tubos. Los microtubos individuales (0,2 ml) son opcionales si no hay bandas disponibles.
[3] Solamente necesario si no hay disponible una centrífuga para portaobjetos.

Equipo	N.º de catálogo de Greiner Bio-One	Cantidad
CheckScanner™	862 070	1
Software CheckReport™ básico	862 080	1
Software CheckReport™ complemento para Papill**oCheck**®	862 081	1
Cámara de hibridación oCheck® con soporte de portaobjetos	447 070	1
Asa para el soporte de portaobjetos	447 001	1
Recipiente de lavado oCheck®[4]	447 020	1
oCheck® VacSet[5]	863 080	1
oCheck® VacPump[5]	863 070	1

Enzimas necesarias

- Taq polimerasa: Polimerasa ADN HotStarTaq® 5 U/µl (Qiagen; 203203, 203205, 203207, 203209)
- Uracil-N-glucosilasa: Uracil-ADN-glucosilasa 1 U/µl (Fermentas; #EN0361, #EN0362)

Otros consumibles necesarios

- Agua grado PCR
- Agua destilada o desionizada
- Guantes de un solo uso

Otro equipo necesario

- Microcentrífuga para microtubos de 1,5 y 2 ml
- Centrífuga para tubos de polipropileno de 50 ml (por ejemplo, BeckmanCoulter, centrífuga Allegra X-22, rotor de ángulo fijo C0650) o centrífuga para portaobjetos (por ejemplo, Labnet: Slide Spinner, VWR International: centrífuga Galaxy MiniArray)
- Microcentrífuga para microtubos individuales de 0,2 ml o bandas PCR de 8 tubos (por ejemplo, Labnet: centrífuga Spectrafuge Mini)
- Termociclador de PCR:
  GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
  o Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Baño María (50 °C)
- Micropipetas (diferentes tamaños entre 1 y 1000 µl)
- Multipipeta de 8 canales (rango: 5 - 50 µl), por ejemplo, Brand Transferpette®-8 (Brand)
- Pipeteador para pipetas de vidrio y plástico
- Agitador Vortex
- Gradillas para diferentes microtubos

Otro hardware necesario

- PC (consulte los requisitos del sistema en el Manual de instrucciones de CheckScanner™ y el software CheckReport™)

[4] Para realizar el procedimiento de lavado de Papill**oCheck**®, se necesitan tres recipientes de lavado oCheck®.
[5] Solamente necesario en combinación con n.º de catálogo 515 050.

3. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

El transporte del equipo de ensayo Papill**oCheck**® se realiza a temperatura ambiente. No obstante, es preciso almacenar el equipo inmediatamente después de recibirlo **a 4-8 °C** y protegerlo de la luz. Si se almacenan correctamente, el equipo de ensayo Papill**oCheck**® y sus componentes se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada. Asimismo, en estas condiciones, la vida útil no se desvía de la fecha de caducidad una vez abiertos el equipo y sus componentes.

4. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

El equipo de ensayo Papill**oCheck**® está destinado únicamente para el uso en un laboratorio, y no como fármaco, para uso doméstico ni otros fines. Lleve siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de seguridad, y siga las instrucciones de seguridad proporcionadas en esta sección.

Los siguientes componentes del equipo de ensayo Papill**oCheck**® contienen elementos nocivos o peligrosos.

Componente	Símbolo de peligroso	Símbolo de peligro	Frases de riesgo	Frases de riesgo	Frases de seguridad
Tampón de hibridación	Tiocianato de guanidina (25-60 %)		Nocivo*	R 20/21/22 R 32 R 52/53	S13 S61 S36/37
Tampón B	<20 % de dodecilsulfato de sodio		Peligroso*	R 21/22 R 36/37/38	S26 S36/37

* La etiqueta de peligro no es necesaria para paquetes pequeños de un máximo de 125 g o ml (según 67/548/CEE Art. 25, 1999/45/CE Art. 12 y las normas alemanas GefStoffV § 20(3) y TRGS 200 7.1). Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad.

Frases de riesgo

R 21/22	Nocivo en contacto con la piel y por ingestión
R 20/21/22	Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel
R 32	En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos
R 36/37/38	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel
R 52/53	Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático

Frases de seguridad

S13	Manténgase lejos de alimentos, bebidas y piensos
S26	En caso de contacto con los ojos, lávese inmediatamente con agua abundante y acuda a un médico
S36/37	Utilizar indumentaria y guantes de protección adecuados
S61	Evitar su liberación al medio ambiente. Consulte las instrucciones especiales/fichas de datos de seguridad.

La versión actual de las fichas de datos de seguridad de este producto se puede descargar del sitio web de Greiner Bio-One: **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

5. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Después de lavar y secar el microchip Papill**oCheck**®, se pueden desechar las soluciones de lavado I, II y III sin precauciones especiales. Deseche el microchip Papill**oCheck**® usado, los componentes del equipo sin utilizar y la mezcla de hibridación no utilizada con los desechos químicos del laboratorio. Respete todas las normativas locales, provinciales y nacionales en lo referente al desecho de materiales.

6. INTRODUCCIÓN

En prácticamente todos los casos de cáncer del cuello uterino (el segundo cáncer más común en mujeres en todo el mundo), se encuentra una infección persistente con un virus del papiloma humano (VPH) carcinógeno.[1] Hasta la fecha, se han identificado más de 100 tipos de VPH, 40 de los cuales son de transmisión sexual e infectan la mucosa genital. Los tipos de VPH cervicouterino se clasifican en un grupo de alto riesgo (VPH de alto riesgo o VPHAR) o en uno de bajo riesgo (VPH de bajo riesgo o VPHBR). Mientras que los tipos de VPH de alto riesgo se asocian a una mayor posibilidad de padecer cáncer cervicouterino, los tipos de bajo riesgo causan principalmente condilomas genitales benignos.[2] No obstante, incluso dentro del grupo de alto riesgo, el riesgo relativo de desarrollar cáncer o lesiones cervicales intraepiteliales (NIC) depende del tipo.[3] Alrededor del 70 % de todos los casos de cáncer cervicouterino están vinculados a una infección persistente de VPH 16 o 18. Los tipos de bajo riesgo con mayor prevalencia son VPH 6 y 11. Partiendo de la base de un vínculo etiológico prácticamente absoluto entre el VPH carcinógeno y el cáncer cervicouterino, en la actualidad se está teniendo en cuenta la realización de pruebas del VPHAR para la detección primaria del cáncer cervicouterino.[4]

6.1 Uso previsto

Papill**oCheck**® es un equipo de diagnóstico para la detección cualitativa y la genotipificación de 24 tipos del virus del papiloma humano en preparaciones de ADN a partir de citologías cervicouterinas humanas. Este equipo únicamente puede ser utilizado por personal cualificado.

Papill**oCheck**® cumple los requisitos de la directiva sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro (98/78/CE) y por tanto presenta la marca de conformidad CE. Todos los resultados diagnósticos generados con Papill**oCheck**® se deben interpretar en combinación con otros hallazgos clínicos o de laboratorio.

6.2 Tipos de VPH detectables con Papill**oCheck**®

Papill**oCheck**® permite identificar los 18 tipos de alto riesgo ☐ y los 6 tipos de bajo riesgo ☐ del virus del papiloma humano (VPH) (**Tabla 1**).

Tabla 1: Tipos de VPH detectables con Papill**oCheck**®

VPH 16	**VPH 45**	**VPH 59**	**VPH 6**
VPH 18	**VPH 51**	**VPH 66**	**VPH 11**
VPH 31	**VPH 52**	**VPH 68**	**VPH 40**
VPH 33	**VPH 53**	**VPH 70**	**VPH 42**
VPH 35	**VPH 56**	**VPH 73**	**VPH 43**
VPH 39	**VPH 58**	**VPH 82**	**VPH 44 / VPH 55***

* Papill**oCheck**® no permite diferenciar entre el VPH 44 y el VPH 55.

1 Walboomers, J. et al (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 189(1):12-9.
2 Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16:1–17.
3 Bosch F.X. et al. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 26 Suppl 10:K1-16.
4 Meijer, C.J. et al. (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. Int J Cancer. 124(3):516-20.

6.3 Principio del ensayo

Papill**oCheck**® es un equipo de ensayo basado en micromatrices para la detección y la genotipificación de un fragmento del gen E1 del genoma del virus del papiloma humano (VPH). El procedimiento del ensayo se resume en la **figura 1**.

Antes del análisis Papill**oCheck**®, se debe extraer ADN de una muestra de citología cervicouterina. La toma de muestras y la extracción de ADN no forman parte del equipo de ensayo Papill**oCheck**®. Greiner Bio-One también ofrece productos especializados para la toma de muestras (equipo de toma de muestras Papill**oCheck**®) y la extracción de ADN (equipo de extracción de ADN oCheck®); se deben adquirir por separado (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2).

Después de la extracción de ADN genómico humano y vírico de una muestra cervicouterina, se amplifica un fragmento de 350 bp del gen E1 vírico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en presencia de un conjunto de cebadores específicos del VPH. En la misma reacción, se amplifica un fragmento de una copia del gen humano ADAT1 (adenosina desaminasa específica del ARNt humano1) con el fin de controlar la presencia de material de muestra humano en la muestra cervicouterina (control de muestra) y una plantilla de control interna presente en el Papill**oCheck**® PCR MasterMix para controlar el rendimiento de la PCR (control de PCR). Además, el Papill**oCheck**® PCR MasterMix contiene dUTP. Por tanto, se puede eliminar la contaminación cruzada de reacciones PCR anteriores mediante el uso del tratamiento con uracil-N-glucosilasa (UNG) (consulte el capítulo 8.2.2).

A continuación, los productos de la PCR se hibridan según sondas de ADN específicas y controles en el microchip enlazados a la superficie del microchip de Papill**oCheck**®. Cada microchip contiene 12 micromatrices de ADN, lo que permite el análisis simultáneo de 12 muestras cervicouterinas. Durante la hibridación, el ADN unido se marca de forma fluorescente y el no unido se elimina en los pasos de lavado subsiguientes. Se supervisa la eficiencia de la hibridación (control de hibridación).

Finalmente, el microchip Papill**oCheck**® se escanea, analiza y evalúa de forma automática mediante CheckScanner™ y el software CheckReport™, respectivamente (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2). CheckScanner™ es un escáner láser bicolor (longitudes de onda de excitación de 532 nm y 635 nm), que permite la detección de la señal fluorescente generada por la presencia de productos de la amplificación específicos de VPH así como los controles (consulte el capítulo 6.4.2). El software CheckReport™ permite visualizar, analizar y evaluar los resultados, y muestra de forma automática los valores correspondientes tanto de los tipos de VPH detectados como de los controles en un informe detallado.

El informe indica claramente la presencia o la ausencia de uno o varios de los 24 tipos de VPH detectables y los completos controles en el microchip garantizan la elevada fiabilidad del análisis.

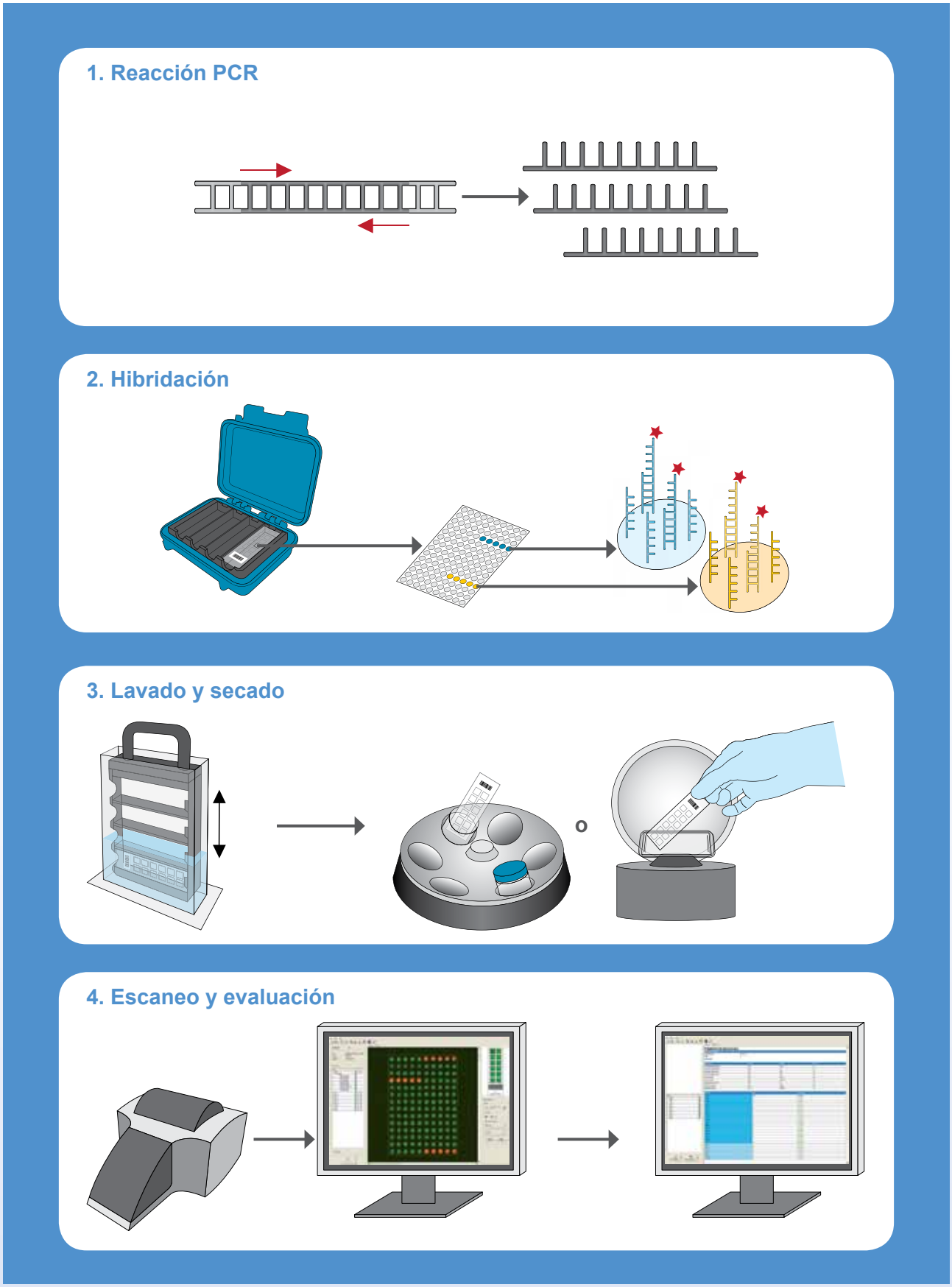


Figura 1: Procedimiento del ensayo Papill**oCheck**®

1. **Reacción PCR:** después de la extracción del ADN, se amplifican un fragmento de 350 bp del gen E1 vírico y fragmentos de dos objetivos de control mediante PCR. A continuación, los productos de la amplificación se hibridan según sondas de ADN complementario en el microchip.
2. **Hibridación:** se detecta cada tipo de VPH mediante una sonda de ADN específica presente en cinco réplicas. Durante la hibridación, se introduce el marcado fluorescente.
3. **Lavado y secado:** se elimina el ADN sin unir en los pasos de lavado subsiguientes.
4. **Escaneo y análisis:** se escanea, analiza y evalúa el microchip Papill**oCheck**® utilizando CheckScanner™ y el software CheckReport™. Se crea un informe que indica claramente la presencia o la ausencia de uno o varios de los 24 tipos de VPH detectables.

6.4 Diseño del microchip PapillоCheck®

6.4.1 Distribución del microchip PapilloCheck®

Cada microchip Papill**oCheck**® contiene 12 micromatrices designadas como pocillos del A1 al B6. Cada micromatriz Papill**oCheck**® se compone de 28 sondas diferentes y tiene un reborde elevado. Cada sonda se marca en cinco réplicas. La distribución de la micromatriz Papill**oCheck**® se ilustra en la **figura 2** y los controles del microchip se explican con más detalle en el capítulo 6.4.2.

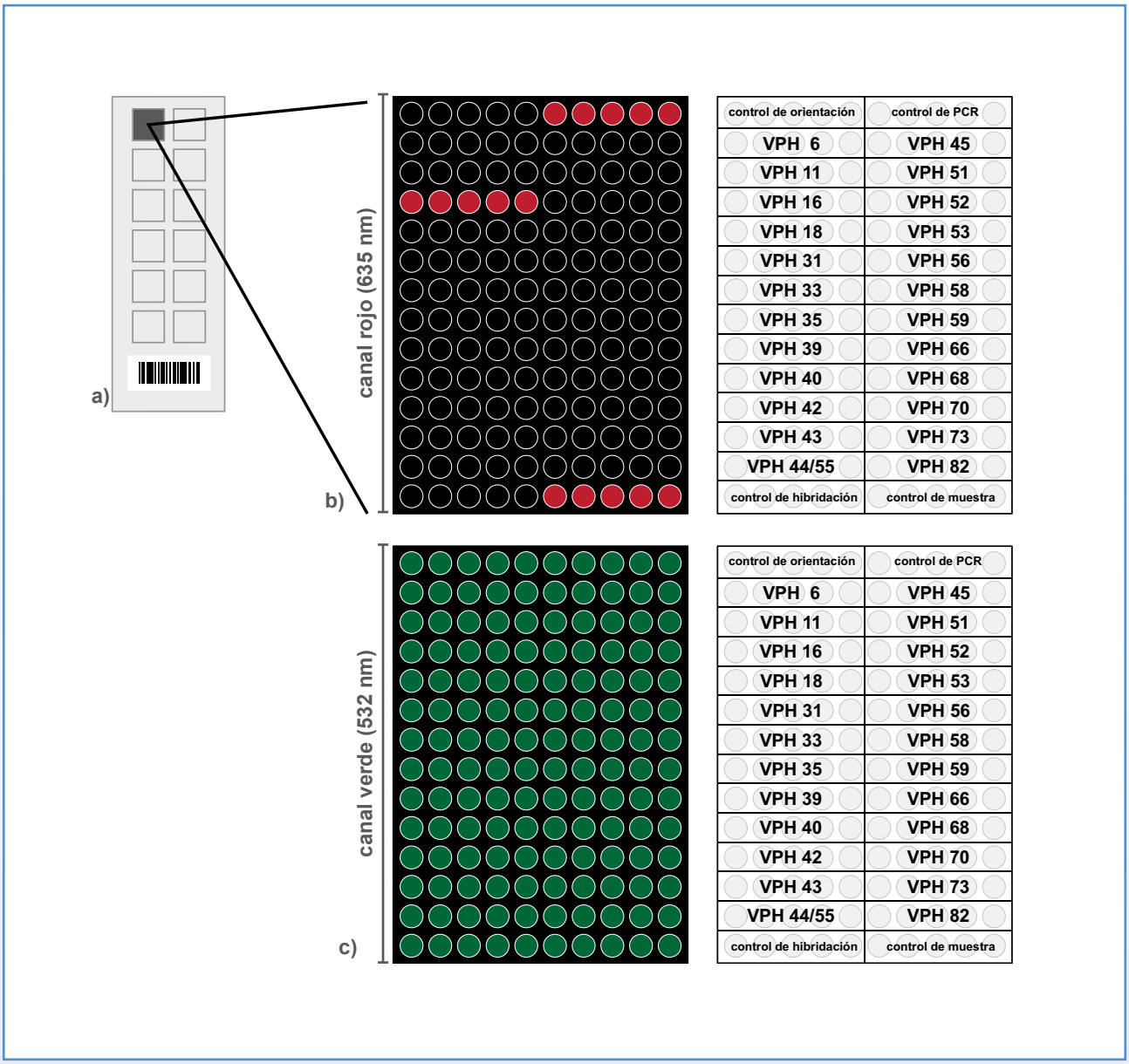


Figura 2: Diseño del microchip Papill**oCheck**®
a) Dibujo esquemático del microchip Papill**oCheck**®. **b)** y **c)** Imágenes mostradas por el software CheckReport™ para las dos longitudes de onda de excitación diferentes usadas para el escaneo (b) canal rojo: 635 nm; c) canal verde: 532 nm) y dibujos esquemáticos de la distribución de la micromatriz Papill**oCheck**®. Se indican las sondas específicas del tipo de VPH y los controles del microchip.

6.4.2 Controles del microchip

El diseño del microchip de ADN Papill**oCheck**® incorpora unos completos controles integrados en el microchip. Varios sistemas de control supervisan todos los pasos críticos del ensayo y el procesamiento del microchip, lo que incluye la calidad de la muestra y la extracción de ADN (control de muestra), la calidad de la reacción PCR (control de PCR), la eficiencia de la hibridación (control de hibridación), así como la homogeneidad de las marcas y la calidad de impresión (control de orientación y control de impresión). Además de la presencia o ausencia de los tipos de VPH, el software CheckReport™ muestra de forma automática tanto los valores correspondientes de los controles como los tipos de VPH detectados en un informe detallado. Para la lectura de los diferentes controles, se utilizan ambas longitudes de onda de excitación de CheckScanner™. Para el control del rendimiento del ensayo (control de muestra y de PCR), se usa el canal rojo (longitud de onda de excitación de 635 nm), mientras que la calidad de la hibridación y el microchip (control de hibridación, orientación e impresión) se evalúa en el canal verde (longitud de onda de excitación de 532 nm).

Control de muestra
Papill**oCheck**® controla la calidad de la muestra y/o la extracción de ADN mediante la amplificación de un fragmento de una copia del gen humano ADAT1 (adenosina desaminasa específica del ARNt humano1). Si hay presente ADN humano en una cantidad adecuada en el ADN extraído de la muestra cervicouterina, se genera una señal fluorescente en las marcas de control de muestra.

Si la amplificación de ADAT1 es insuficiente o inexistente, el software CheckReport™ indicará el error en el control de muestra (Failed) y se deberá repetir el análisis, como consecuencia de una cantidad insuficiente de células en la muestra cervicouterina y/o el rendimiento insuficiente de la extracción (consulte el capítulo 9).

Control de PCR
Papill**oCheck**® también controla la calidad de la reacción PCR. La amplificación de una plantilla de control interna presente en el Papill**oCheck**® PCR MasterMix genera una señal en las marcas de control de PCR en el microchip Papill**oCheck**®. Además, se evalúa la calidad de la reacción de amplificación automáticamente en el software CheckReport™. Si el rendimiento de la PCR es inferior a un umbral predefinido, el software CheckReport™ indicará el error en el control de PCR (Failed) y se deberá repetir el análisis (consulte el capítulo 9).

Si la cantidad de ADN de VPH en la muestra es muy elevada, la señal fluorescente de las marcas de control de PCR puede ser débil o incluso no aparecer, como consecuencia de la competición durante la reacción PCR. En este caso, la señal fluorescente de al menos una sonda especifica de VPH debe superar un umbral predefinido para que el ensayo se considere válido.

Control de hibridación
Papill**oCheck**® controla la eficiencia de la hibridación mediante una sonda marcada con fluorescencia en el tampón de hibridación Papill**oCheck**®, que hibrida según secuencias de ADN específicas en el microchip Papill**oCheck**®. Una hibridación con la eficiencia adecuada da como resultado señales fluorescentes en cada marca de la matriz. Los resultados de cinco marcas de control de hibridación en el microchip Papill**oCheck**® también se evalúan mediante el software CheckReport™.

Control de orientación y de impresión
Las marcas de control de orientación del microchip Papill**oCheck**® generan señales fluorescentes con independencia de la eficiencia del proceso de hibridación. Estas marcas se usan en el software CheckReport™ como puntos de guía para la búsqueda de marcas correctas, que es un requisito previo para analizar las señales correctamente. Además, se controla la calidad del proceso de impresión mediante la presencia de una señal fluorescente verde en cada marca del microchip (control de impresión).

7. INSTRUCCIONES PARA LA SECUENCIA DE TRABAJO DE PAPILLOCHECK®

7.1 Instrucciones generales

Al implementar en un laboratorio técnicas de vanguardia de uso actual en la biología molecular, se deben tener en cuenta las siguientes instrucciones para garantizar la máxima seguridad del personal del laboratorio y la elevada calidad de los resultados.

En general, la ejecución de técnicas de biología molecular tales como la extracción de ADN, la amplificación y la detección de productos de la amplificación requiere de personal con la formación adecuada. Además, es preciso contar con una secuencia de trabajo clara y bien estructurada que impida la obtención de resultados erróneos como consecuencia de la degradación o la contaminación del ADN por productos de la amplificación. Para garantizar esto, es necesario separar las zonas dedicadas a la extracción, la amplificación y la detección, según se describe en el capítulo 7.2.

Cada zona debe estar provista de equipos, consumibles, batas de laboratorio y guantes diferentes. No transfiera nunca las batas, los guantes ni el equipo de una zona separada a otra.

7.2 Separación de las salas

La **figura 3** muestra un ejemplo de cómo se puede dividir un laboratorio en tres secciones diferentes. Una se utiliza únicamente para la extracción de ADN, otra se dedica a la preparación y generación de las reacciones PCR y la última se dedica a la hibridación y al análisis. Cada sala se debe utilizar exclusivamente para la aplicación o técnica indicadas a fin de impedir la contaminación de las muestras. El uso de diferentes colores puede ayudar a evitar un intercambio accidental de equipo y consumibles entre las zonas.

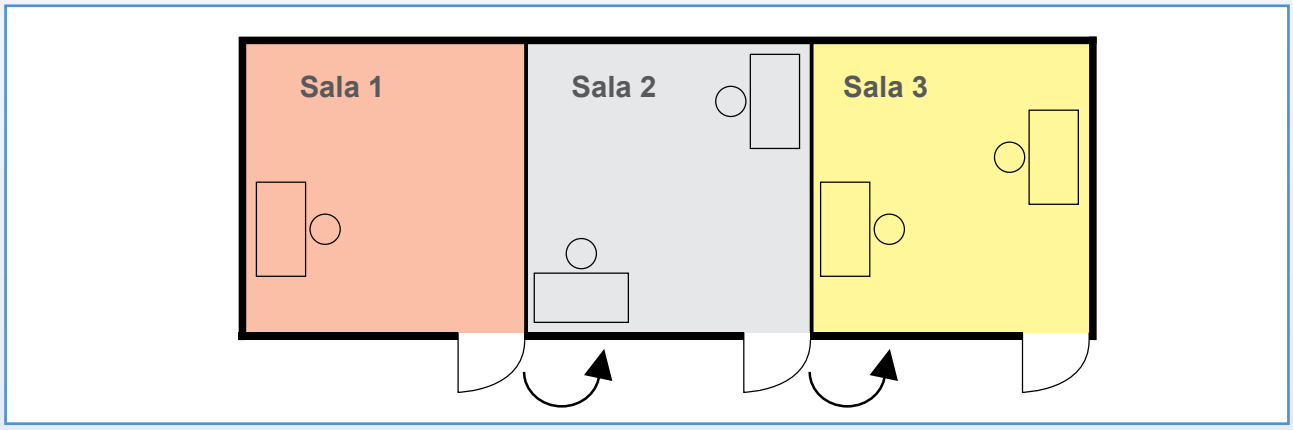


Figura 3: Separación de las salas
Sala 1: se debe realizar el procedimiento de extracción de ADN completo en esta sala.
Sala 2: en esta sala, se prepara la mezcla de reacción para PCR y se crean alícuotas (idealmente, bajo una campana PCR). La adición de las muestras de ADN extraídas en la sala 1 se debe realizar en un espacio diferente en la sala 2.
Sala 3: en la tercera sala del laboratorio, se llevan a cabo la reacción de hibridación, los pasos de lavado y el secado del microchip. Además, se usa CheckScanner™ junto con el software CheckReport™ para realizar el análisis final del ensayo Papill**oCheck**®.

! No se deben intercambiar equipo ni consumibles entre las diferentes salas y espacios del laboratorio. Por tanto, la duplicación del equipo y los consumibles es necesaria y se debe tener en cuenta al equipar el laboratorio.

7.3 Advertencias y precauciones

7.3.1 Prevención de la contaminación

- Se debe llevar una bata de laboratorio durante el procedimiento y utilizar una bata diferente para cada sala del laboratorio.
- Se deben llevar guantes durante cada paso del análisis y se deben cambiar con frecuencia, especialmente durante la extracción de ADN.
- El lugar de trabajo se debe descontaminar con un limpiador adecuado.
- No toque nunca la parte interior de la tapa del microtubo. Para evitar la contaminación cruzada, abra solamente un tubo cada vez.
- Utilice puntas de filtro de micropipeta anti-aerosol adecuadas (libres de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN humano). Es preciso cambiar siempre las puntas de pipeta tras una transferencia de líquido.

7.3.2 Instrucción para la manipulación de microchips de ADN

- Los microchips de ADN se deben utilizar en un entorno libre de polvo. Se debe evitar la sedimentación de polvo y otras partículas en la superficie del microchip.
- No toque la zona de hibridación en la superficie del microchip.
- El único lado del microchip destinado a la hibridación es el etiquetado.
- No utilice rotuladores para identificar los microchips de ADN, ya que pueden producir una fluorescencia no específica en el microchip.
- Las matrices de ADN son exclusivamente de un solo uso. No se pueden reutilizar los microchips hibridados.
- Almacene los microchips sin usar en el envase original dentro de la bolsa con cierre que contiene el desecante.

7.3.3 Precauciones generales

- Este equipo está destinado únicamente al diagnóstico in vitro y debe ser utilizado exclusivamente por personal formado en las prácticas de laboratorio para el diagnóstico in vitro.
- Cuando reciba el equipo, compruebe que los componentes no estén dañados. Si uno de los componentes estuviera dañado (por ejemplo, frascos de tampón), póngase en contacto con su distribuidor local de Greiner Bio-One. No utilice los componentes dañados del equipo, ya que podría obtener unos resultados deficientes.
- No utilice el equipo de ensayo Papill**oCheck**® después de la fecha de caducidad.
- No utilice reactivos caducados.
- No mezcle reactivos procedentes de lotes diferentes.
- Use únicamente los reactivos y el equipo proporcionados con el equipo y aquellos recomendados por el fabricante.
- Se debe realizar la calibración y el mantenimiento de las micropipetas, el baño María y el bloque de calentamiento con regularidad.
- El pipeteado de pequeñas cantidades de líquido en el intervalo de microlitros resulta dificultoso. Por lo tanto, realice el pipeteado con la mayor precisión posible.
- Para evitar la contaminación microbiana de los reactivos, tenga cuidado al extraer alícuotas de los microtubos.
- Todos los pasos de centrifugado deberían realizarse a temperatura ambiente (18-25 °C).

7.3.4 Seguridad en el trabajo

- Extreme la precaución al manipular las muestras biológicas que contengan material de origen humano potencialmente infeccioso. Para minimizar el riesgo de infección con material potencialmente infeccioso, se recomienda trabajar en una cabina de flujo laminar hasta que complete la lisis de las muestras. Manipule y elimine todas las muestras biológicas como si pudieran transmitir agentes infecciosos.
- No pipetee nunca las soluciones utilizando la boca.
- No coma, beba, fume ni aplique productos cosméticos en las zonas de trabajo.
- Evite el contacto directo con las muestras biológicas y evite salpicarlas o pulverizarlas.
- Lleve siempre una bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad cuando trabaje con muestras humanas.
- Lávese las manos de forma exhaustiva después de manipular muestras y reactivos.

8. PROCEDIMIENTO DE PAPILLOCHECK®

En el siguiente capítulo, se describen con detalle los diferentes pasos de trabajo que dan como resultado un informe detallado que indica claramente la presencia o la ausencia de uno o varios de los 24 tipos de VPH detectables en cada muestra cervicouterina analizada. La **figura 4** muestra un resumen de los diferentes pasos de trabajo necesarios. También indica el apartado correspondiente donde se describe el paso de ensayo específico. Los pasos de trabajo se deben realizar en el orden indicado en este capítulo. Los pasos prácticos específicos se indican con una flecha azul ➠.

> **!** La toma de muestras, la extracción de ADN y el análisis con el software CheckReport™ no forman parte del equipo de ensayo Papilll**oCheck**®. Por tanto, la descripción de estos pasos de trabajo ofrecida en este capítulo está abreviada. Para obtener información más detallada, consulte los manuales de instrucciones correspondientes, por ejemplo, del equipo de toma de muestras Papill**oCheck**®, el equipo de extracción de ADN oCheck® y el software CheckReport™.

8.1 Toma de muestras y extracción de ADN

8.1.1 Toma de muestras

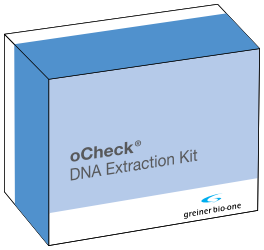
La toma de muestras no forma parte del equipo de ensayo Papill**oCheck**®. Greiner Bio-One también ofrece un equipo de toma de muestras especializado (equipo de toma de muestras Papill**oCheck**®); consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2.

Papill**oCheck**® se ha validado con ADN preparado con el equipo de extracción de ADN oCheck® a partir de citologías cervicouterinas humanas con uno de los siguientes sistemas o medios de toma de muestras:

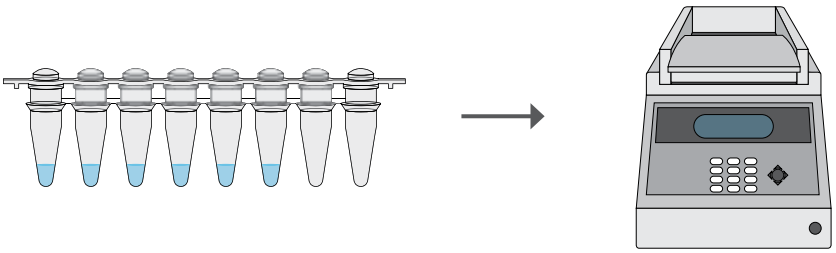
- Equipo de toma de muestras Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, EE. UU.)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.)
- STM™ (Qiagen, Hilden, Alemania)

Para obtener más información sobre los sistemas de extracción de ADN o los medios de transporte adecuados, póngase en contacto con el distribuidor local de Greiner Bio-One o visite el sitio web de Greiner Bio-One: **www.gbo.com/bioscience/biochips_download**

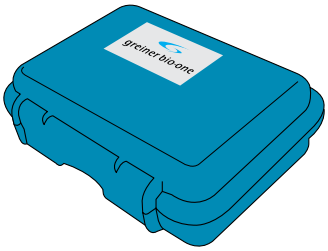
Capítulo 8.1.2 Extracción de ADN



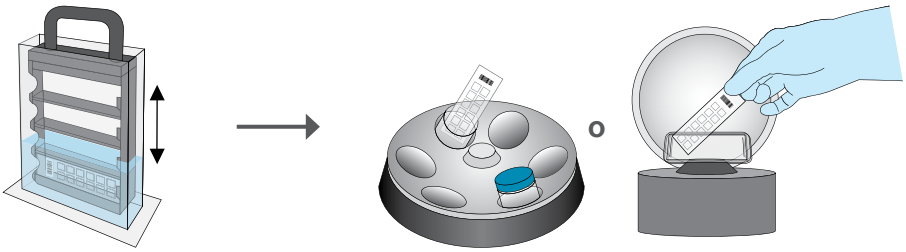
Capítulo 8.2 PCR



Capítulo 8.3.2 Hibridación



Capítulo 8.3.3 Lavado y secado



Capítulo 8.4 Escaneo y evaluación

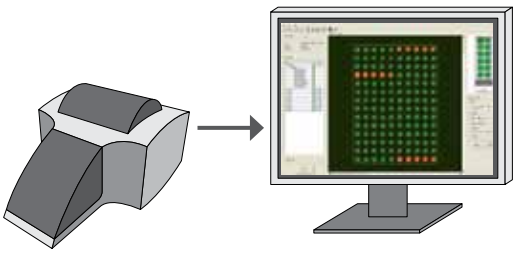


Figura 4: Resumen de los diferentes pasos de trabajo de Papill**oCheck®**

8.1.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN no forma parte del equipo de ensayo Papill**oCheck**®. La extracción de ADN antes del análisis Papill**oCheck**® se debe realizar con el equipo de extracción de ADN oCheck®, también suministrado por Greiner Bio-One (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2). Siga las instrucciones de uso detenidamente cuando utilice el equipo de extracción de ADN oCheck®.

Para la extracción de ADN con el equipo de extracción de ADN oCheck®, se deben utilizar 250 µl de solución de muestra.

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen
- con el equipo de toma de muestras Papill**oCheck**® (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 070)
- en medio de toma de muestras PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, EE. UU.)

se pueden procesar directamente.

Las muestras de citologías cervicouterinas que se tomen en
- el medio de toma de muestras Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) se deben lavar antes de usarlas: centrifugue **250 µl** de la muestra durante **5 minutos a 11.000 g** y resuspenda el pellet en **250 µl** de agua destilada. Después, se pueden procesar los **250 µl** con el equipo de extracción de ADN oCheck®.

Las muestras de citologías cervicouterinas que se tomen en
- el medio de toma de muestras STM™ (Qiagen, Hilden, Alemania) se deben diluir: use **100 µl** de la muestra y añada **150 µl** de agua destilada. Después, se pueden procesar los **250 µl** de la muestra diluida con el equipo de extracción de ADN oCheck®.

En general, si la muestra de la citología cervicouterina parece estar muy concentrada y ya agregada, es necesario diluir y homogeneizar la muestra antes de comenzar el proceso de extracción de ADN.

Las muestras de citologías cervicouterinas que estén muy diluidas y no presenten células visibles deben concentrarse a fin de obtener un mayor volumen de células para la extracción de ADN: centrifugue un máximo de 1000 µl de la muestra durante 5 minutos a 11.000 g y resuspenda el pellet en 250 µl de agua destilada. Después, se pueden procesar los 250 µl con el equipo de extracción de ADN oCheck®.

!

Este paso de concentración solo es adecuado para las muestras de citologías cervicouterinas que se tomaron con el equipo de toma de muestras Papill**oCheck**®, en el medio de toma de muestras PreservCyt® o Surepath™. Si se usó el medio de toma de muestras STM™, no es posible concentrar mediante centrifugado.

8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método muy sensible que puede detectar cantidades extremadamente reducidas de ADN. Se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la reacción (consulte el capítulo 7). Se requieren polimerasa HotStarTaq® y uracil-N-glucosilasa, las cuales no se suministran con el equipo de ensayo Papill**oCheck**® y deben adquirirse por separado (consulte el capítulo 2).

! El equipo de ensayo Papill**oCheck**® se ha validado con polimerasa HotStarTaq® de Qiagen y uracil-N-glucosilasa de Fermentas (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2). Es obligatorio usar estas enzimas para lograr el rendimiento establecido.

8.2.1 Preparación del termociclador

El equipo de ensayo Papill**oCheck**® se ha validado con los siguientes termocicladores:
- GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)

! Es absolutamente necesario usar uno de los termocicladores mencionados antes para lograr el rendimiento establecido.

El programa del termociclador de la PCR Papill**oCheck**® se resume en la **tabla 2**.

Tabla 2: Programa del termociclador para la PCR Papill**oCheck**®

Tiempo	Temp. °C	N.º de ciclos
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s 25 s 45 s	95 °C 55 °C 72 °C	40
30 s 45 s	95 °C 72 °C	15
Espera	10 °C	

Además, se deben establecer los siguientes parámetros de ejecución en cada termociclador. Para obtener una descripción de cómo establecer estos parámetros, consulte el manual de instrucciones del termociclador en cuestión.

GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
Establezca el volumen de reacción en 26 µl, la velocidad de incremento en “9600” y use la temperatura de tapa 103 °C.

Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Use la herramienta de conversión de método (Convert Method) del termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler para introducir el programa de PCR Papill**oCheck**® y elija el modo “9600 Emulation Mode”. Establezca el volumen de reacción en 26 µl y la temperatura de tapa, en 103 °C.

8.2.2 Tratamiento de uracil-N-glucosilasa (UNG)[5]

El Papill**oCheck**® PCR MasterMix contiene dUTP, que se incorpora a los productos de la amplificación durante la PCR Papill**oCheck**®, lo que convierte los productos de la PCR en susceptibles a la degradación mediante UNG. La UNG divide el producto de la PCR en los sitios donde se ha incorporado un residuo de desoxiuridilato. Los productos de la PCR divididos no se amplificarán en una reacción subsiguiente. Por tanto, se puede utilizar un tratamiento de UNG para eliminar la contaminación cruzada de anteriores reacciones PCR.[6]

- Diluya la uracil-N-glucosilasa **1:200** en agua grado PCR. Use una nueva dilución de UNG para cada reacción PCR Papill**oCheck**® preparada (consulte el capítulo 8.2.3). No reutilice la UNG diluida.
- Mezcle la dilución de UNG con cuidado; para hacerlo, mézclela con un Vortex durante 2 segundos y después centrifúguela, o bien pipetéela arriba y abajo varias veces.

La concentración original de uracil-N-glucosilasa es 1 U/µl. Por consiguiente, la concentración de la dilución es 0,005 U/µl.

> **!** El equipo de ensayo Papill**oCheck**® se ha validado con uracil-N-glucosilasa de Fermentas (consulte el capítulo 2). Es obligatorio usar esta enzima para lograr el rendimiento establecido.

- Añada **1 µl** de esta dilución a cada reacción PCR Papill**oCheck**® (consulte el capítulo 8.2.3, **Tabla 3**).

Esta cantidad es suficiente para eliminar la contaminación cruzada de PCR. Tenga cuidado de no usar una solución de UNG con mayor concentración, ya que esto podría tener un efecto negativo sobre el rendimiento de la PCR, lo que reduciría la sensibilidad de Papill**oCheck**®.

En general, para el tratamiento de UNG, la mezcla de la reacción PCR se incuba durante 20 minutos a 37 °C. Después, se inactiva la UNG con un paso de incubación adicional de 15 minutos a 95 °C. Estos dos pasos ya están incorporados en la PCR Papill**oCheck**® y se corresponden con los dos primeros pasos del programa del termociclador (consulte la **tabla 2**). Durante el segundo paso (15 minutos a 95 °C), se producen tanto la inactivación de la uracil-N-glucosilasa como la activación de la polimerasa HotStarTaq®.

> **!** El sistema de UNG incorporado de la PCR Papill**oCheck**® solamente eliminará la contaminación cruzada con productos de la PCR de reacciones PCR anteriores. No se podrá eliminar otro tipo de contaminación, por ejemplo, la que se produce durante la preparación de las muestras, la extracción de ADN o la adición de la plantilla de PCR. Por lo tanto, es necesario seguir las instrucciones y las precauciones especiales para impedir la contaminación, descritas en el capítulo 7.

5 La adquisición de Papill**oCheck**® va acompañada de una licencia limitada bajo los números de patente de EE. UU. 5.035.996; 5.683.896; 5.945.313; 6.287.823; y 6.518.026 y las patentes correspondientes en otros países.

6 Longo, M.C., et al., Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, Gene, 93, 125-128, 1990.

8.2.3 Preparación de la reacción PCR

A excepción de la polimerasa HotStarTaq® y la uracil-N-glucosilasa, el Papill**oCheck**® PCR MasterMix ya contiene todos los componentes necesarios para realizar la reacción PCR (tampón de PCR, $MgCl_2$, dNTPs, cebadores, plantilla de control de PCR).

> **!** El equipo de ensayo Papill**oCheck**® se ha validado con la polimerasa HotStarTaq® de Qiagen (consulte el capítulo 2). Es obligatorio usar esta enzima para lograr el rendimiento establecido.

Idealmente, la preparación de la mezcla de reacción se debe realizar en un entorno con protección, como una campana PCR, para evitar la contaminación de la reacción.

- Prepare la mezcla de reacción (compuesta por Papill**oCheck**® PCR MasterMix, polimerasa HotStarTaq® y uracil-N-glucosilasa) para la cantidad necesaria de reacciones PCR según lo descrito en la **Tabla 3**.

Para analizar varias muestras, se debe preparar la mezcla de reacción en un lote (en la cantidad necesaria para todos los análisis). Para adaptarse a las variaciones de volumen durante el pipeteado, se recomienda aumentar el número de reacciones (n) a tenor de 1 por cada microchip (=n+1), por ejemplo, prepare un volumen de mezcla de reacción para 13 reacciones de amplificación si se van a analizar 12 muestras (consulte la **tabla 3**). Utilice siempre una ampolla de MasterMix para las reacciones de un microchip.

> **!** Se recomienda incluir un control negativo para cada lote de Papill**oCheck**® PCR MasterMix preparado. Se pueden usar como control negativo el tampón de elución del ADN del equipo de extracción de ADN adecuado o agua de categoría PCR.

- Mezcle exhaustivamente la mezcla de reacción; para hacerlo, mézclela con un Vortex durante 2 segundos y después centrifúguela, o bien pipetéela arriba y abajo varias veces.
- Divida la mezcla de reacción en alícuotas pipeteando **21 µl** de la mezcla de reacción para cada reacción PCR en un microtubo para PCR fino de 0,2 ml.

Realice la adición del ADN mensajero en una zona de trabajo diferente a la de la preparación de la mezcla de reacción (consulte el capítulo 7.2).

- Añada **5 µl** del ADN extraído a cada reacción PCR y mézclelo con un Vortex durante 2 segundos y después centrifúguelo, o bien pipetéelo arriba y abajo varias veces. El volumen total de una reacción PCR es **26 µl**.
- Coloque los microtubos en el termociclador e inicie la reacción PCR con el programa del termociclador descrito en el capítulo 8.2.1 (**Tabla 2**).

> **!** Una vez completada la PCR, se deberían usar los productos de la amplificación inmediatamente para la hibridación, o bien se deberían almacenar a oscuras a -20 °C durante una semana.

Tabla 3: Preparación de la reacción PCR Papill**oCheck**®

	1 reacción	13 reacciones (1 microchip)	26 reacciones (2 microchips)	39 reacciones (3 microchips)	52 reacciones (4 microchips)
Papill**oCheck**® **PCR MasterMix**	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
Polimerasa HotStarTaq® (5 U/µl)	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N-glucosilasa (dilución de 1:200, 0,005 U/µl)	1 µl	13 µl	26 µl	39 µl	52 µl
Volumen total antes de añadir el ADN de muestra	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl
ADN extraído de muestra cervicouterina (ADN mensajero)	5 µl				
Volumen total por reacción	26 µl				

8.3 Hibridación y lavado

8.3.1 Preparación

La hibridación se debe realizar a temperatura ambiente (20-25 °C). Comience con los preparativos necesarios para la hibridación y los pasos de lavado al menos 30 minutos antes de iniciar el procedimiento de hibridación.

- Para disolver los potenciales precipitados en los tampones de lavado e hibridación, expóngalos a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 30 minutos y mézclelos bien antes de usarlos.

El almacenamiento del equipo de ensayo Papill**oCheck**® a 4-8 °C puede dar como resultado la precipitación de dodecilsulfato de sodio en los tampones B y de hibridación. Deje que las soluciones se equilibren a temperatura ambiente y después mezcle el tubo en el Vortex o agite el frasco hasta que se disuelvan los precipitados.

- Prepare la cámara de hibridación oCheck®: coloque una nueva toallita de papel humedecida en la cámara de hibridación y cierre la tapa para crear una atmósfera saturada de humedad.

Para evitar la evaporación del pequeño volumen de mezcla de hibridación utilizada en el microchip, es necesario realizar la hibridación en una atmósfera saturada de humedad. Greiner Bio-One suministra una cámara de hibridación especializada para el análisis Papill**oCheck**® (consulte el capítulo 2).

- Incube la cantidad necesaria de microchips Papill**oCheck**® en la cámara de hibridación preparada a temperatura ambiente (20-25 °C) durante al menos 10 minutos.

! El soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación contiene un imán solamente en uno de sus extremos. Si se van a hibridar en paralelo menos de cuatro microchips Papill**oCheck**®, tenga cuidado de llenar el soporte con microchips Papill**oCheck**® empezando desde el lado opuesto al imán. De lo contrario, los microchips Papill**oCheck**® no quedarán sumergidos durante el procedimiento de lavado.

- Prepare las soluciones de lavado I, II y III según las siguientes instrucciones.

Preparación de las soluciones de lavado I, II y III:

- Prepare la mezcla de solución de lavado para las soluciones de lavado I, II y III adecuadas para el número de microchips Papill**oCheck**® que se vayan a analizar, como se muestra en la **tabla 4**.
- Divida tres alícuotas con el mismo volumen de mezcla de solución de lavado en tres recipientes de lavado oCheck® diferentes y etiquételas como solución de lavado I, II y III. Cada recipiente de lavado oCheck® contiene una escala grabada, que indica la cantidad correcta de solución de lavado necesaria para un máximo de 4 microchips. Use esta escala para comprobar la cantidad de tampón.
- Precaliente la solución de lavado II a 50 °C en un baño María con temperatura controlada durante al menos 20 minutos antes de usarla. Asegúrese de que el nivel de llenado del baño María sea equivalente al de la solución de lavado II.

Tabla 4: Preparación de la mezcla de solución de lavado
Los volúmenes resumidos en esta tabla son suficientes para los tres pasos de lavado (soluciones de lavado I, II y III) para el número indicado de microchips Papill**oCheck**®.

	Número de microchips Papill**oCheck**®			
Componentes	**1**	**2**	**3**	**4**
Agua destilada o desionizada	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Tapón A Papill**oCheck**®	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Tapón B Papill**oCheck**®	1,75 ml	3,5 ml	5,25 ml	7 ml
Volumen total	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml

!

No reutilice nunca las soluciones de lavado, ya que esto podría resultar en una acumulación del producto de PCR eliminado, lo que podría interferir con los resultados de Papill**oCheck**®. Use soluciones de lavado nuevas para cada ensayo.

La mezcla de solución de lavado preparada se puede almacenar durante un máximo de una semana a temperatura ambiente. Compruebe si hay precipitados de dodecilsulfato de sodio. De haberlos, caliente la mezcla de solución de lavado hasta que se disuelvan y equilíbrela de nuevo a temperatura ambiente. A continuación, realice los preparativos para el siguiente experimento de hibridación.

8.3.2 Hibridación

La hibridación se debe realizar a temperatura ambiente (20-25 °C). Los pasos de trabajo del principio para hibridar los productos de PCR de la reacción PCR Papill**oCheck**® en el microchip Papill**oCheck**® se muestran en la **figura 5**.

- Mezcle los productos de la PCR antes de usarlos. Centrifúguelo brevemente.

Si los productos de la PCR se almacenaron a -20 °C hasta la hibridación, primero descongélelos antes de mezclarlos y después continúe según lo descrito.

- Mezcle el tampón de hibridación en el Vortex antes de usarlo. Centrifúguelo brevemente.
- Mezcle **30 µl** del tampón de hibridación Papill**oCheck**® en un microtubo nuevo de una banda PCR con 8 tubos con **5 µl** del producto de la PCR mezclándolo con un Vortex, o bien pipeteándolo arriba y abajo varias veces.
- Centrifúguelo brevemente.
- Transfiera **25 µl** de la mezcla de hibridación a cada pocillo del microchip usando los seis canales de una multipipeta. Evite la formación de burbujas de aire.

Se recomienda procesar seis muestras en paralelo usando una multipipeta de 8 canales y bandas PCR con 8 tubos (consulte la **figura 5**). Esto aumenta la eficiencia y velocidad de la manipulación, lo que reduce el riesgo de evaporación. Si se va a procesar más de un portaobjetos al mismo tiempo, es obligatorio usar una multipipeta para lograr el tiempo correcto de hibridación.

Si es posible, hibride los 12 pocillos del microchip. Si va a procesar menos de 12 muestras, deje vacíos los pocillos sin usar. Los pocillos sin usar de un microchip procesado no se pueden usar para muestras futuras.

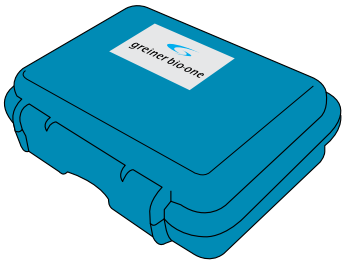
! Manipule el microchip con cuidado para no derramar la mezcla de hibridación. Los derrames pueden ocasionar la contaminación cruzada de muestras y resultados falsamente positivos.

Incube el microchip durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) dentro de la cámara de hibridación preparada en una atmósfera oscura y saturada de humedad. Tenga cuidado de no mover la cámara de hibridación durante el proceso.

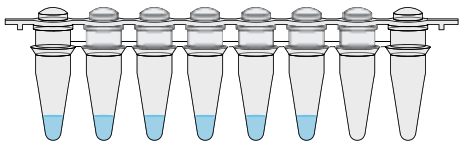
! No cambie nunca el tiempo ni la temperatura de incubación de la reacción de hibridación, ya que podría causar una pérdida de intensidad en la señal fluorescente o un aumento de la fluorescencia no específica.

No deje que los microchips hibridados entren en contacto directo con la luz del sol.

- Prepare una atmósfera saturada de humedad en la cámara de hibridación.
- Incube la cantidad necesaria de microchips Papill**oCheck**® en la cámara de hibridación a temperatura ambiente (20-25 °C) (consulte el capítulo 8.3.1).



- Mezcle 30 µl del tampón de hibridación Papill**oCheck**® en un microtubo de 0,2 ml de una banda PCR con 5 µl del producto de la PCR. Mézclelo bien.



- Transfiera **25 µl** de la mezcla de hibridación a cada pocillo del microchip Papill**oCheck**® usando una multipipeta.

- Cierre la cámara de hibridación e incube el microchip Papill**oCheck**® durante exactamente **15 minutos** a temperatura ambiente (20-25 °C).

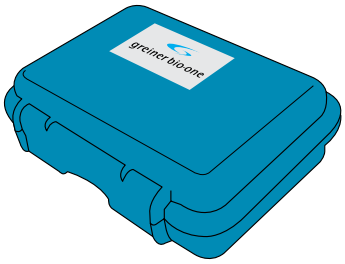


Figura 5: Pasos de trabajo del proceso de hibridación

8.3.3 Lavado y secado

El equipo especializado suministrado por Greiner Bio-One permite realizar el lavado en paralelo de hasta cuatro microchips Papill**oCheck**® (consulte el capítulo 2). El equipo adicional necesario para procesar los microchips Papill**oCheck**® se compone de tres recipientes de lavado oCheck® y un asa para el soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación.

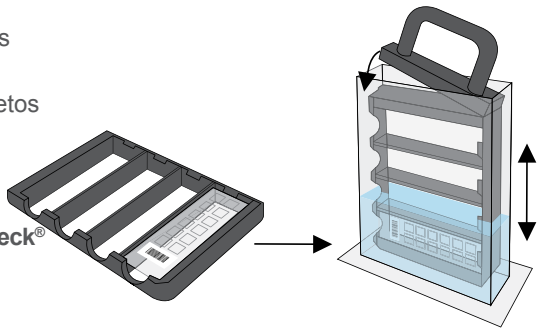
Los diferentes pasos de trabajo se muestran en la **figura 6**.

- Retire cuidadosamente el soporte de portaobjetos magnético que contiene los portaobjetos hibridados de la cámara de hibridación.
- Coloque el soporte de portaobjetos que contiene los portaobjetos directamente en el recipiente de lavado oCheck® con la solución de lavado I. Asegúrese de que el lado magnético esté orientado hacia arriba.
- Encaje el asa oCheck® en el soporte de portaobjetos y comience el primero de los tres pasos de lavado.
- Lave el microchip a **temperatura ambiente (20-25 °C)** en la solución **de lavado I** moviéndolo rápidamente arriba y abajo durante **10 segundos**. Las matrices deben mantenerse sumergidas en la solución de lavado en todo momento.
- Lave el microchip durante **60 segundos** en la **solución de lavado II** a **50 °C** moviendo el soporte de portaobjetos arriba y abajo con fuerza.
- Lave el microchip a **temperatura ambiente (20-25 °C)** en la **solución de lavado III** moviéndolo rápidamente arriba y abajo durante **10 segundos**.
- **Inmediatamente**, retire el líquido de la superficie del microchip mediante centrifugado. Si se utiliza una microcentrífuga especial para micromatrices, centrifúguelo durante 1 minuto. Si se usa una centrífuga apta para tubos de 50 ml, coloque cada microchip Papill**oCheck**® lavado en un tubo de 50 ml y centrifúguelo a **temperatura ambiente** durante **3 minutos a 500 g**.

El microchip Papill**oCheck**® está ahora listo para escanearse, lo que se debería hacer de inmediato. Para limpiar los recipientes de lavado oCheck®, enjuáguelos varias veces en agua después de cada procedimiento completo de lavado y secado.

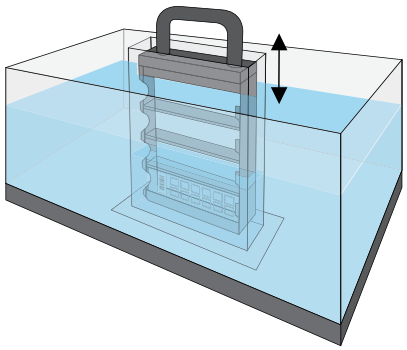
Primer paso de lavado

- Retire con cuidado el soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación.
- Coloque rápidamente el soporte de portaobjetos en el recipiente de lavado oCheck® con la solución de lavado I
- Encaje el asa oCheck®
- Lave el microchip o los microchips Papill**oCheck**® en la solución de lavado I a **temperatura ambiente** durante **10 segundos** subiendo y bajando el soporte de portaobjetos



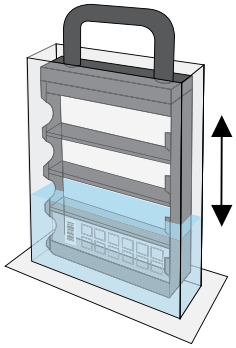
Segundo paso de lavado

- Lave el microchip o los microchips Papill**oCheck**® en la solución de lavado II en un baño María a **50 °C** durante **60 segundos** subiendo y bajando el soporte de portaobjetos.



Tercer paso de lavado

- Lave el microchip o los microchips Papill**oCheck**® en la solución de lavado III a **temperatura ambiente** durante **10 segundos** subiendo y bajando el soporte de portaobjetos.



Secado

- Inmediatamente, retire el líquido de la superficie de los microchips Papill**oCheck**® mediante centrifugado.

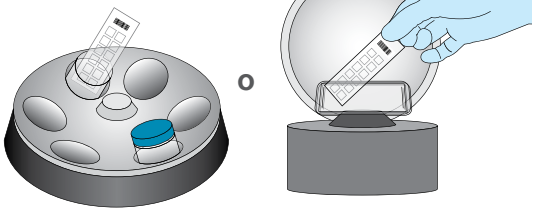


Figura 6: Pasos de trabajo del proceso de lavado
Diferentes pasos de lavado y procedimiento de secado antes del análisis del microchip Papill**oCheck**® con CheckScanner™ y el software CheckReport™

8.4 Escaneado y evaluación del microchip Papill**oCheck**®

Coloque el microchip o los microchips Papill**oCheck**® en CheckScanner™ y realice el escaneado como se describe con más detalle en el manual del usuario del software CheckReport™.

Para obtener información más detallada sobre la instalación de CheckScanner™ y el software CheckReport™, así como los requisitos del sistema informático, consulte los manuales de instrucciones correspondientes de CheckScanner™ y el software CheckReport™.

Siempre que se analicen datos con el software CheckReport™, asegúrese de que la versión del software CheckReport™ instalada en el PC coincida con la indicada en el equipo Papill**oCheck**® usado actualmente. Si las versiones no coinciden, actualice el software CheckReport™. La versión más reciente del software se puede descargar en el sitio web de Greiner Bio-One:
www.gbo.com/bioscience/biochips_download

9. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Si aparece uno de los siguientes mensajes de error durante el escaneo del microchip o si el análisis Papill**oCheck**® genera un error debido a controles específicos en el microchip, proceda como se describe a continuación. No dude en ponerse en contacto con el distribuidor local de Greiner Bio-One si tiene alguna duda o experimenta dificultades al usar Papill**oCheck**®.

PROBLEMA y causa	Comentarios y sugerencias
MENSAJE DE ERROR "COULD NOT READ BARCODE" (NO SE PUDO LEER EL CÓDIGO DE BARRAS)	
Código de barras dañado	Compruebe si hay daños en el código de barras. Escriba el código de barras manualmente cuando aparezca la ventana correspondiente.
El microchip no se cargó correctamente	Compruebe la orientación del microchip y escanéelo en la orientación correcta.
MENSAJE DE ERROR "MISSING SPOTS" (FALTAN MARCAS), ERROR EN EL CONTROL DE IMPRESIÓN O EN EL CONTROL DE ORIENTACIÓN	
Polvo en el microchip	Repita la hibridación del producto o los productos de PCR en otro microchip.
Formación de burbujas de aire durante la transferencia de líquido en el microchip	Repita la hibridación del producto o los productos de PCR en otro microchip. Pipetee con cuidado para evitar la formación de burbujas de aire.
ERROR DEL CONTROL DE HIBRIDACIÓN	
Temperatura incorrecta de la solución de lavado II	El segundo paso de lavado se debe realizar a 50 °C. Asegúrese de que la solución de lavado II se caliente a 50 °C.
Temperatura incorrecta del baño María	El segundo paso de lavado se debe realizar a 50 °C. Compruebe la temperatura del baño María. Asegúrese de que el baño María esté a una temperatura de 50 °C. Si es necesario, confirme la temperatura con un termómetro.
Preparación incorrecta de la mezcla de hibridación	Repita la preparación de la mezcla de hibridación con los volúmenes correctos e hibride los productos de la PCR en otro microchip.

PROBLEMA y causa	Comentarios y sugerencias
ERROR DEL CONTROL DE PCR	
Polimerasa de ADN HotStarTaq® no añadida al MasterMix	Repita el análisis Papill**oCheck®** a partir de la preparación de la reacción PCR.
Adición de una polimerasa de ADN HotStarTaq® con funcionamiento incorrecto al MasterMix	Repita el análisis Papill**oCheck®** a partir de la preparación de la reacción PCR.
Adición de uracil-N-glucosilasa sin diluir al MasterMix	Repita el análisis Papill**oCheck®** a partir de la preparación de la reacción PCR.
Mezclado insuficiente de la mezcla de reacción	Repita el análisis Papill**oCheck®** a partir de la reacción PCR. Asegúrese de mezclar bien la mezcla de reacción.
Inhibidores de PCR presentes en la muestra	Repita la extracción de ADN y el análisis Papill**oCheck®**.
Hibridación realizada sin añadir el producto de PCR	Repita la hibridación.
Mezclado insuficiente de la mezcla de hibridación	Repita la hibridación.
Problemas con el termociclador	Compruebe el funcionamiento del termociclador, así como la programación correcta del mismo (pasos de PCR, incremento térmico, volumen). Atención: use el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) o Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) en combinación con Papill**oCheck®**.
ERROR DEL CONTROL DE MUESTRA	
ADN de muestra no añadido a la reacción PCR	Repita el análisis Papill**oCheck®** a partir de la reacción PCR.
Error de preparación del ADN	Repita la extracción de ADN.
Material de muestra insuficiente	Toma de muestras incorrecta. La muestra está muy poco concentrada. Concéntrela de acuerdo con la descripción en el capítulo 9.1 y repita la extracción de ADN o la toma de muestras.
LOS CONTROLES DE MUESTRA Y/O DE PCR NO GENERAN ERROR PERO MUESTRAN UN VALOR DE SNR 0	Este resultado se considera válido si el software CheckReport™ detecta como mínimo un tipo de VPH en la muestra con una señal por encima de un umbral definido. Entonces, es posible que el control de muestra y/o de PCR muestre señales fluorescentes débiles o no las muestre en absoluto debido a competición durante la PCR.

10. ASISTENCIA TÉCNICA

Greiner Bio-One cuenta con un departamento de servicio técnico compuesto por científicos con amplia experiencia tanto práctica como teórica en biología molecular y en los productos oCheck®. Si se tiene alguna duda o experimenta dificultades con los productos oCheck®, no dude en ponerse en contacto con el distribuidor local de Greiner Bio-One.

11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DE PAPILLOCHECK®

11.1 Rendimiento analítico de PapillOCheck®

11.1.1 Sensibilidad analítica

El límite de detección (LD) se estableció usando plásmidos de referencia para cada tipo de VPH detectable que contenga la región E1 que es el objetivo de Papill**oCheck**®. Los LD se resumen en la **tabla 8**.

Tabla 8: Límites de detección de los tipos de VPH detectables

Genotipo de VPH	Copias / reacción	pg/ml**
VPH 6	30*	0,052
VPH 11	150*	0,26
VPH 16	50*	0,086
VPH 18	300*	0,516
VPH 31	300*	0,522
VPH 33	300*	0,519
VPH 35	750*	1,29
VPH 39	30*	0,052
VPH 40	30*	0,052
VPH 42	30*	0,052
VPH 43	100*	0,175
VPH 44	30*	0,052
VPH 45	50*	0,087
VPH 51	30*	0,051
VPH 52	100*	0,174
VPH 53	30*	0,052
VPH 56	30*	0,052
VPH 58	150*	0,255
VPH 59	50*	0,087
VPH 66	100*	0,171
VPH 68	30*	0,052
VPH 70	30*	0,052
VPH 73	200*	0,338
VPH 82	30*	0,052

* La concentración validada de cada plásmido de referencia de VPH se preparó en dos series de dilución independientes y se midió en tres repeticiones de la concentración analizada (es decir, un total de 6 repeticiones por concentración). Además, cada análisis contenía 10 ng de ADN humano. En caso de variación respecto a los datos validados, las concentración del plásmido concreto se aumentaron o redujeron y después se volvieron a analizar (6 repeticiones de dos series de dilución independientes). El límite de detección fue la concentración más baja en que las 6 repeticiones fueron positivas.

** Analizado directamente, sin consideración de la preparación del ADN. La cantidad se refiere al ADN de VPH contenido en el plásmido.

11.1.2 Especificidad analítica - Tipos de VPH

Los plásmidos de referencia para los tipos de VPH enumerados se analizaron con 2,12 x 10^6 copias/ reacción PCR.

VPH 6b, VPH 11, VPH 13, VPH 16, VPH 18, VPH 26, VPH 30, VPH 31, VPH 33, VPH 34, VPH 35, VPH 39, VPH 40, VPH 42, VPH 43, VPH 44, VPH 45, VPH 51, VPH 52, VPH 53, VPH 54, VPH 55, VPH 56, VPH 58, VPH 59, VPH 61, VPH 66, VPH 67, VPH 68, VPH 69, VPH 70, VPH 71, VPH 73, VPH 74, VPH 81, VPH 82, VPH 84, VPH 85, VPH 91.

Se detectaron las siguientes hibridaciones cruzadas:
VPH 55 da una señal en la sonda de VPH 44. Como resultado, el software CheckReport™ muestra un resultado combinado de VPH 44/VPH 55.

Es posible que VPH 13 tenga una reacción cruzada con la sonda de VPH 11, pero no da como resultado una señal de falso positivo, ya que VPH 13 no está presente en las muestras cervicouterinas.

11.1.3 Especificidad analítica - Organismos no VPH

Los siguientes organismos no VPH se han analizado con Papill**oCheck**® (5-10 ng de ADN genómico). No se detectaron señales positivas.

Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffii, Actinobacillus actinomycetemcomitans Serovar c, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces viscosus, Bacillus subtilis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Campylobacter concisus, Campylobacter gracilis, Campylobacter rectus, Candida albicans, Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena, Citrobacter amalonaticus, Citrobacter freundii, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Citrobacter koseri, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Eikenella corrodens, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Enterococcus durans, Enterococcus faecali, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Eubacterium nodatum , Fusobacterium nucleatum, Gardnerella vaginalis, Hafnia alvei, Kingella denitrificans, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus casei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus rhamnosus,Lactobacillus vaginalis, Mogibacterium timidum, Morganella morganii, Mycoplama hominis, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma orale, Mycoplasma pirum, Mycoplasma salivrium, Mycoplosma pneumoniae, Neisseria elongata, Neisseria gonorrhoeae, Peptoniphilus asaccharolyticus, Peptostreptococcus anaerobius, Peptostreptococcus micros, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Proteus hauseri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus ssp. aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus saprophyticus, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus agalactiae, Streptococcus constellatus, Streptococcus criceti, Streptococcus cristatus, Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis, Streptococcus sobrinus, Tannerella forsythensis (antes: Bacteroides forsythus), Treponema denticola, Ureaplasma uralyticum, Veillonella parvula.

11.2 Repetibilidad

Como evaluación de la repetibilidad del ensayo, se analizaron cinco muestras, cada una con tres plantillas de referencia de VPH diferentes y ADN genómico humano con Papill**oCheck**®. Se variaron los números de copias de los diferentes objetivos de VPH presentes en las muestras, así como el ADN humano de fondo (consulte la **tabla 9**). Cada muestra se analizó con Papill**oCheck**® en cinco réplicas independientes. Las réplicas las analizó el mismo técnico en un plazo de tres días.

Tabla 9: Composición de las muestras para el análisis de repetibilidad

Id. de muestra	Tipo de VPH	Cantidad de ADN mensajero	Múltiplo del límite de detección
muestra 1	VPH 16 VPH 18 VPH 31 ADN genómico humano	180 copias 1.500 copias 1.400 copias 1 ng	3 10 30
muestra 2	VPH 16 VPH 18 VPH 31 ADN genómico humano	180 copias 1.500 copias 1.400 copias 5 ng	3 10 30
muestra 3	VPH 16 VPH 18 VPH 45 ADN genómico humano	1.800 copias 450 copias 300 copias 5 ng	30 3 10
muestra 4	VPH 16 VPH 18 VPH 45 ADN genómico humano	10.000 copias 5.000 copias 20.000 copias 2,5 ng	- - - -
muestra 5	VPH 18 VPH 31 VPH 45 ADN genómico humano	4.500 copias 500 copias 90 copias 2,5 ng	30 10 3

Para las cinco muestras y cada análisis repetido, se detectaron los tres tipos de VPH correctos y el análisis fue negativo para el tipo no incluido. Por tanto, 75 de los 75 resultados de análisis individuales (5 muestras x 5 réplicas x 4 plantillas de VPH diferentes usadas) fueron correctos.

11.3 Reproducibilidad

La reproducibilidad del equipo de ensayo Papill**oCheck**® se determinó usando 22 muestras clínicas (consulte la **tabla 10**) con concentraciones de VPH próximas al límite de detección. La determinación se realizó mediante el mismo método, con material de muestra idéntico, por diferente personal en diferentes laboratorios con instrumental diferente. Los resultados se clasificaron de acuerdo con las muestras positivas, si se detectaron tipos de VPH idénticos en infecciones únicas o dobles, o bien si se detectaron dos o tres tipos de VPH idénticos en infecciones múltiples con tres o cuatro tipos, respectivamente.

Tabla 10: Resultados de los análisis de reproducibilidad

N.º de muestra	Resultado de laboratorio 1	Resultado de laboratorio 2	Concordancia
1	VPH 33	VPH 33	+
2	VPH 35	VPH 35	+
3	negativo	negativo	+
4	VPH 45	VPH 45	+
5	VPH 51, VPH 52	VPH 51, VPH 52	+
6	VPH 51, VPH 56	VPH 51, VPH 56	+
7	VPH 16, VPH 39, VPH 68	VPH 16, VPH 39, VPH 68, VPH 82	+
8	VPH 39, VPH 68	VPH 39, VPH 68	+
9	VPH 16	VPH 16	+
10	negativo	negativo	+
11	VPH 56, VPH 44/55	VPH 56, VPH 44/55	+
12	negativo	negativo	+
13	VPH 11, VPH 18, VPH 56	VPH 11, VPH 18, VPH 56	+
14	VPH 51, VPH 44/55	VPH 51, VPH 44/55	+
15	VPH 53, VPH 58, VPH 43	VPH 53, VPH 58, VPH 68, VPH 43	+
16	negativo	negativo	+
17	VPH 16	VPH 16	+
18	VPH 16	VPH 16	+
19	VPH 45	VPH 45	+
20	VPH 16	VPH 16	+
21	VPH 53, VPH 58	VPH 53, VPH 58	+
22	VPH 31	VPH 31	+

Se obtuvieron resultados concordantes para todas las muestras clínicas. Las señales de tipos adicionales detectados por el laboratorio 2 para muestras con infecciones múltiples 7 (VPH 82) y 15 (VPH 68) quedaron justo por encima del umbral definido y los resultados discordantes se clasificaron como no problemáticos.

11.4 Solidez

Con el fin de evaluar la solidez del sistema de ensayo Papill**oCheck**®, se consideraron variaciones de los siguientes parámetros:

- Temperatura de hibridación
- Tiempo de hibridación
- Temperatura de lavado
- Tiempo de lavado

Todos los análisis se realizaron en réplicas de 3 con concentraciones elevadas de plantilla (1 ng de plásmido de referencia de VPH o aproximadamente 200 x 10^6 copias por muestra). Los intervalos de valores de parámetros determinados en los que es posible una detección robusta de VPH con Papill**oCheck**® se resumen en la **tabla 11**.

Tabla 11: Solidez de PapilloCheck®

Parámetro	Intervalo
Temperatura de hibridación	20-25 °C
Tiempo de hibridación	13-17 minutos
Temperatura de lavado	48-52 °C
Tiempo de lavado	Primer paso de lavado 10-15 segundos
	Segundo paso de lavado 60-75 segundos
	Tercer paso de lavado 10-15 segundos

11.5 Rendimiento clínico de PapillOCheck®

Para determinar el rendimiento clínico del ensayo Papill**oCheck**® en lo que respecta a especificidad y sensibilidad clínicas, se realizó un estudio comparativo con Papill**oCheck**® y el ensayo GP5+/6+-PCR-EIA.[7] Para este estudio, se analizaron muestras de 1.437 mujeres representativas con citologías normales (grupo de control) de más de 40 años de edad (mediana de edad, 49 años; intervalo de edades, entre 40 y 60 años) y de 192 mujeres representativas (mediana de edad, 34 años; intervalo de edades, entre 30 y 60 años) con lesiones CIN3+ confirmadas mediante histología (grupo de caso). Todas las muestras usadas en este estudio se tomaron originariamente durante la ronda de referencia a mujeres en el grupo de intervención del ensayo de implementación controlado aleatorizado basado en población POBASCAM.[8]

Después de restringir el análisis Papill**oCheck**® a los 14 tipos de VPHAR objetivo de GP5+/6+-PCR-EIA, Papill**oCheck**® tenía una sensibilidad clínica para ≥ CIN3 del 95,8 % (184/192; IC del 95 %: 92,8-98,8) y una especificidad clínica para ≥ CIN2 del 96,7 % (IC del 95 %: 95,7-97,7). En comparación, estas cifras fueron 96,4 % (185/192; IC del 95 %: 93,9-98,9) y 97,7 % (IC del 95 %: 96,9-98,5), respectivamente, para GP5+6+-PCR-EIA (consulte las **tablas 5 y 6**).

Tabla 5: Comparación de los resultados de PapillOCheck® (14 tipos de VPHAR) y GP5+/6+-PCR-EIA estratificados para controles y casos.

	PapillOCheck® (14 tipos de VPHAR)	GP5+/6+-PCR-EIA		Total
		-	+	-
Controles	- + total	1.386 (96,5 %) 18 (1,3 %) 1.404 (97,7 %)	4 (0,3 %) 29 (2,0 %) 36 (2,3 %)	1.390 (96,7 %) 47 (3,3 %) 1.437
Casos	- + total	4 (2,1 %) 3 (1,6 %) 7 (3,6 %)	4 (2,1 %) 181 (94,3 %) 185 (96,4 %)	8 (4,2 %) 184 (95,8 %) 192

Tabla 6: Especificidad y sensibilidad clínicas de PapillOCheck® y GP5+/6+-PCR-EIA (resultados de uno o varios de los 14 tipos de VPHAR VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 o 68).

14 VPHAR	PapillOCheck®	GP5+/6+
Sensibilidad clínica para ≥ CIN3	95,8 %	96,4 %
Especificidad clínica para ≥ CIN2	96,7 %	97,7 %

7 Comparison of the clinical performance of Papill**oCheck**® human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. Hesselink AT, Heideman DA, Berkhof J, Topal F, Pol RP, Meijer CJ, Snijders PJ. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):797-801. Epub 2009 Dec 30.

8 Bulkmans, N. W., L. Rozendaal, P. J. Snijders, F. J. Voorhorst, A. J. Boeke, G. R. Zandwijken, F. J. van Kemenade, R. H. Verheijen, K. Groningen, M. E. Boon, H. J. Keuning, M. van Ballegooijen, A. J. van den Brule, and C. J. Meijer. 2004. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. Int. J. Cancer 110:94–101.

Con el fin de evaluar la prevalencia de los tipos de VPH detectados por Papill**oCheck®,** se cribaron citologías cervicouterinas de 881 mujeres.[9] Todas las muestras cervicouterinas se tomaron en medio de toma de muestras STM™ (Qiagen, Hilden, Alemania). El más común fue el VPH 16 con una tasa de detección del 19,4 %. Los siguientes tipos más frecuentes fueron VPH 31, VPH 39, VPH 51 y VPH 52. Las prevalencias para todos los tipos detectables se muestran en la **tabla 7**.

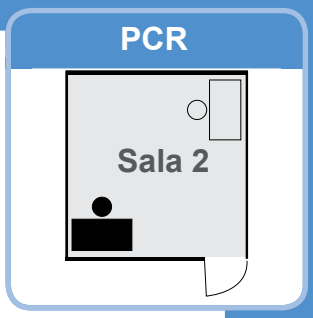
Tabla 7: Prevalencia específica del tipo para tipos de VPH detectados por Papill**oCheck®**

Genotipo de VPH	Prevalencia con Papill**oCheck®**
VPH 16	19,40 %
VPH 31	14,40 %
VPH 39	9,30 %
VPH 51	9,10 %
VPH 52	7,50 %
VPH 56	7,40 %
VPH 58	6,10 %
VPH 53	6,10 %
VPH 42	5,80 %
VPH 66	5,90 %
VPH 68	5,60 %
VPH 45	4,50 %
VPH 33	4,40 %
VPH 18	4,00 %
VPH 70	4,10 %
VPH 44/55	3,10 %
VPH 59	2,50 %
VPH 82	1,90 %
VPH 35	1,60 %
VPH 73	1,50 %
VPH 43	0,80 %
VPH 6	0,60 %
VPH 11	0,60 %
VPH 40	0,40 %

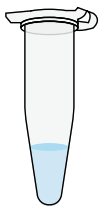
9 Evaluation of the performance of the novel Papill**oCheck®** HPV genotyping test by comparison with two other genotyping systems and the HC2 test. Schopp B, Holz B, Zago M, Stubenrauch F, Petry KU, Kjaer SK, Iftner T. J Med Virol. 2010 Apr;82(4):605-15.

12. PROTOCOLO BREVE DE PAPILLOCHECK®

12.1 Sala 2: PCR - Preparación de la mezcla de reacción

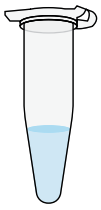


- Diluya la uracil-N-glucosilasa **1:200** en agua grado PCR
- Mezcle la dilución de UNG con cuidado



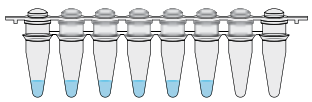
- Prepare la mezcla de reacción para la cantidad necesaria de reacciones PCR

	1 reacción	13 reacciones (1 microchip)	26 reacciones (2 microchips)	39 reacciones (3 microchips)	52 reacciones (4 microchips)
PapillOCheck® PCR MasterMix	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
Polimerasa HotStar Taq® (5 U/µl)	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N-glucosilasa (dilución de 1:200, 0,005 U/µl)	1 µl	13µl	26 µl	39 µl	52 µl
Volumen total antes de añadir el ADN de muestra	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl



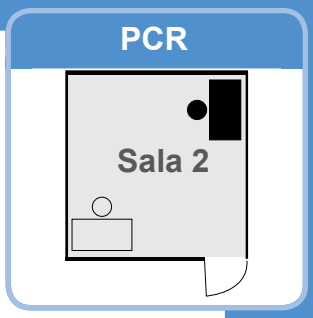
- Mezcle con cuidado la mezcla de reacción

- Divida en alícuotas la mezcla de reacción: añada **21 µl** de la mezcla de reacción para cada reacción PCR en un microtubo para PCR de 0,2 ml de una banda PCR

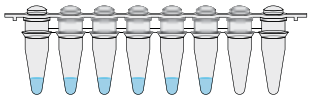


PROTOCOLO BREVE

12.2 Sala 2: PCR - Adición de ADN mensajero / reacción PCR

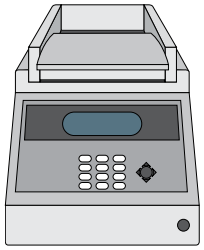


- Añada **5 µl** de ADN mensajero para cada reacción PCR
- Mézclelo bien



- Inicie la reacción PCR con el programa del termociclador preparado

Tiempo	Temp. °C	N.º de ciclos
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s 25 s 45 s	95 °C 55 °C 72 °C	40
30 s 45 s	95 °C 72 °C	15
Espera	10 °C	



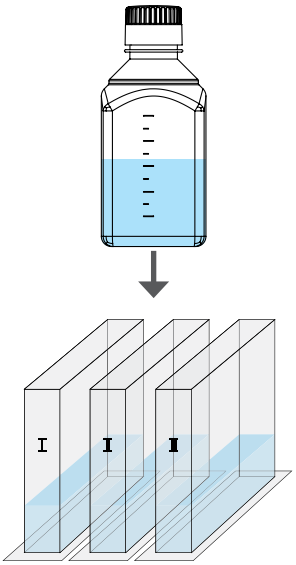
PROTOCOLO BREVE

12.3 Sala 3: Hibridación - Preparación / Reacción de hibridación

! Comience los preparativos al menos 30 minutos antes de la hibridación.

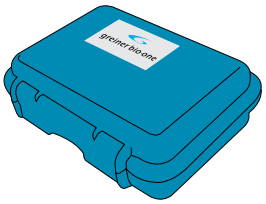
- Disuelva los posibles precipitados en los tampones de lavado e hibridación y mezcle bien
- Prepare la mezcla de solución de lavado para la cantidad de microchips Papill**oCheck**® que se vayan a analizar

	Número de microchips Papill**oCheck**®			
Componentes	**1**	**2**	**3**	**4**
Agua destilada o desionizada	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Tampón A Papill**oCheck**®	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Tampón B Papill**oCheck**®	1,75 ml	3,5 ml	5.25 ml	7 ml
Volumen total	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml

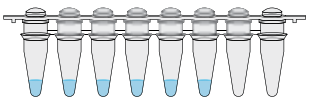


- Divida alícuotas de la mezcla de solución de lavado en tres recipientes de lavado oCheck®
- Precaliente la solución de lavado II en un baño María a **50 °C**

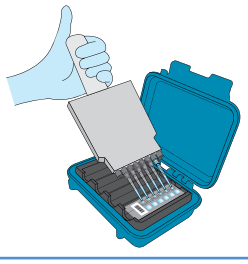
- Incube la cantidad de microchips Papill**oCheck**® que se vayan a analizar en la cámara de hibridación preparada a temperatura ambiente



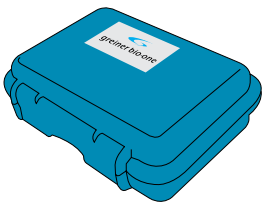
- Mezcle los productos de la PCR y centrifúguelos brevemente
- Mezcle el tampón de hibridación y centrifúguelo brevemente
- Mezcle **30 µl** de tampón de hibridación Papill**oCheck**® con **5 µl** de producto de PCR
- Mézclelo bien y centrifúguelo brevemente



- Transfiera **25 µl** de la mezcla de hibridación a cada pocillo del microchip Papill**oCheck**® usando una multipipeta
- Evite la formación de burbujas de aire



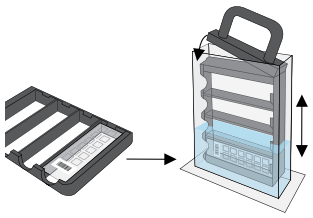
- Incube el microchip Papill**oCheck**® durante exactamente **15 minutos** a **temperatura ambiente (20-25 °C)**



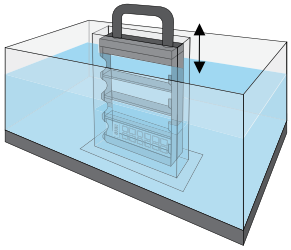
PROTOCOLO BREVE

12.4 Sala 3: Lavado y secado / Escaneo y evaluación

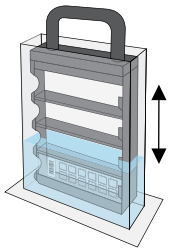
- Retire el soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación
- Coloque el soporte de portaobjetos en el recipiente de lavado oCheck® con la solución de lavado I
- Encaje el asa oCheck®
- Lave el microchip o los microchips Papill**oCheck**® en la solución de lavado I a **temperatura ambiente** durante **10 segundos**



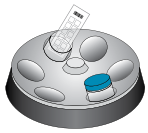
- Lave el microchip o los microchips Papill**oCheck**® en la solución de lavado II precalentada en un baño María a **50 °C** durante **60 segundos**



- Lave el microchip o los microchips Papill**oCheck**® en la solución de lavado III a **temperatura ambiente** durante **10 segundos**



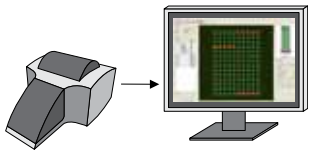
- Retire el líquido de la superficie del microchip Papill**oCheck**® mediante centrifugado



3 minutos 500 g o

1 minuto máx. velocidad

- Escanee el microchip o los microchips Papill**oCheck**® con CheckScanner™
- Realice el escaneo y el análisis según lo descrito en el manual del usuario del software CheckReport™
- Cree los informes



PROTOCOLO BREVE